



## **Study of antimicrobial peptides' activity against bacterial biofilms**

Ana Filipa Daniel da Cruz

**Mestrado em Bioquímica**  
Especialização em Bioquímica Médica

Versão Pública

Dissertação orientada por:  
Professora Doutora Ana Salomé Veiga  
Professora Doutora Ana Coutinho

## RESUMO

O tratamento de infecções bacterianas é geralmente realizado recorrendo a antibióticos. Desde a sua descoberta, estes fármacos têm sido amplamente utilizados pois permitem aliar elevada eficácia e baixo custo. Porém, a prescrição excessiva e inapropriada de antibióticos conduziu ao desenvolvimento de resistência por parte das bactérias. Consequentemente, nos últimos anos, a eficácia dos antibióticos decresceu significativamente pelo que este problema se tornou uma ameaça global. Atualmente, estima-se que a resistência bacteriana a antibióticos seja responsável por cerca de 50 000 mortes por ano, apenas na Europa e nos Estados Unidos, e 700 000 mortes por ano em todo o mundo. Em 2014, a Organização Mundial de Saúde (WHO), emitiu um comunicado em que sublinhava a gravidade desta situação já que ameaça tornar novamente fatais infecções que, atualmente, são consideradas de fácil tratamento, como é o caso das infecções alimentares. Neste comunicado, a WHO frisou a necessidade eminente de novos fármacos eficazes no tratamento de infecções bacterianas e apelou ao seu desenvolvimento, especialmente contra várias estirpes bacterianas cujas hipóteses de tratamento estão seriamente comprometidas, como é o caso de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacteriaceae*.

Os antibióticos convencionais atuam sobre processos metabolicamente ativos das bactérias. Com efeito, a especificidade de atuação destes fármacos facilita o desenvolvimento de resistência por parte das bactérias. Assim, nos últimos anos, têm sido realizados esforços no sentido de encontrar moléculas com mecanismos de ação alternativos de modo a evitar ou, pelo menos, dificultar este fenómeno. Neste âmbito, os péptidos antimicrobianos (AMPs) têm sido propostos como uma alternativa promissora face aos antibióticos convencionais.

Os AMPs correspondem a um grupo de moléculas existente na maioria dos organismos, incluindo vertebrados, plantas e invertebrados, fazendo parte do sistema de defesa destes organismos há milhares de anos. Os AMPs caracterizam-se, em geral, por apresentarem sequências curtas (12-50 resíduos de aminoácidos), carga global positiva devido à predominância de resíduos de aminoácidos básicos, como lisinas e argininas, elevado conteúdo em resíduos hidrófobos, como triptofanos, e ainda por adotarem uma estrutura anfipática na presença de membranas. Estes péptidos são vistos como uma alternativa promissora relativamente aos antibióticos convencionais por diversos motivos: i) uma vez que fazem parte do sistema de defesa dos organismos há milhares de anos sem que tenham induzido o desenvolvimento de resistência, é pouco provável que as bactérias venham a adquirir resistência à sua ação; ii) apresentam um largo espectro de atividade, atuando sobre bactérias, fungos e vírus; e iii) a sua ação é exercida ao nível da membrana bacteriana, por ruptura da mesma, processo este que é independente do estado metabólico das células e desfavorável ao desenvolvimento de resistência por parte das bactérias.

Em trabalhos anteriores do laboratório de acolhimento (MCastanho lab do Instituto de Medicina Molecular) foi identificado um péptido derivado da proteína da cápside do vírus da Dengue com atividade antibacteriana – pepR. No entanto, a sequência deste péptido é relativamente longa (35 resíduos de aminoácidos), o que reduz o seu potencial terapêutico. Deste modo, este trabalho teve como principal objetivo o estudo de péptidos derivados do pepR de modo a diminuir o tamanho da sua sequência ao mesmo tempo que era mantida, ou mesmo otimizada, a sua atividade antibacteriana. Neste sentido foram estudados 12 péptidos derivados do pepR, cuja sequência sofreu truncagens sequenciais de 2 resíduos de aminoácidos a partir do seu terminal N (péptidos N1-pepR/N6-pepR) ou terminal C (péptidos C1-pepR/C6-pepR), num total de 12 resíduos de aminoácidos a partir de cada extremidade, respetivamente. Idealmente, esta abordagem permitirá identificar a região mínima da sequência do pepR que é responsável pela sua atividade antibacteriana.

O trabalho iniciou-se com a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de cada derivado contra as estirpes de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva). Os resultados obtidos revelaram que todos os péptidos possuíam elevada atividade antimicrobiana contra *E. coli*; no entanto, no caso de *S. aureus*, apenas os péptidos C1- a C4-pepR e N1-, N3- e N4-pepR possuíam elevada atividade antimicrobiana. Estes resultados demonstraram que, neste último caso, o aumento do número de resíduos de aminoácidos truncados traduziu-se numa perda de atividade antibacteriana, sendo esta perda mais pronunciada quando a truncagem era efetuada no terminal C do pepR.

De forma a identificar possíveis alterações conformacionais associadas às truncagens sequenciais efetuadas, determinou-se o nível de estrutura secundária adotado pelos vários péptidos derivados do pepR através da técnica de dicroísmo circular (CD), sob três condições experimentais: em solução aquosa e na presença de sistemas membranares que simulam, respetivamente, a membrana plasmática animal e a membrana bacteriana. Os espectros de CD obtidos nas duas primeiras condições revelaram que todos os derivados apresentavam uma conformação *random coil*. Porém, na presença de sistemas membranares aniónicos, que mimetizam a membrana bacteriana, os espectros de CD obtidos foram característicos da conformação em hélice  $\alpha$ . Por outro lado, constatou-se ainda que os péptidos que anteriormente demonstraram maior perda de atividade antimicrobiana (C5- e C6-pepR), apresentavam também menor conteúdo em hélice  $\alpha$  sob estas condições experimentais. No seu conjunto, estes resultados evidenciaram uma relação clara entre a estrutura secundária adotada pelos péptidos na presença de membranas carregadas negativamente e a sua atividade antibacteriana. Estes resultados sugeriram ainda a existência de uma região na zona central da sequência do pepR que é responsável pela sua atividade antimicrobiana.

De forma a auxiliar a identificação desta região putativa do pepR responsável pela sua atividade antimicrobiana recorreu-se ao programa HeliQuest, uma ferramenta bioinformática que prevê a propensão de determinada sequência peptídica em adotar uma conformação helicoidal anfipática, propriedade esta considerada crucial para a atividade antibacteriana dos AMPs. O *screening* da sequência do pepR realizado com esta ferramenta permitiu identificar uma região central da sequência, ligeiramente deslocada para o terminal C, que apresenta elevada anfipaticidade. Analisando esta região mais detalhadamente, constatou-se que a perda de atividade antibacteriana e de estrutura helicoidal por parte dos vários derivados estudados ocorria em paralelo quando resíduos de aminoácidos pertencentes a esta região eram truncados, confirmando assim a sua relevância na atividade antimicrobiana apresentada pelos vários péptidos.

Posteriormente, foi ainda testada a atividade dos derivados do pepR e do próprio pepR contra uma estirpe produtora de biofilmes, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Determinou-se a MIC e a concentração mínima bactericida (MBC) de todos os péptidos, obtendo-se resultados que classificaram a sua atividade antibacteriana como forte e a sua ação como bactericida, à exceção dos péptidos C5- e C6-pepR. Estes resultados corroboraram mais uma vez as conclusões anteriores sobre a relação estrutura-função existente na família dos vários derivados do pepR estudada.

Após esta fase inicial do trabalho, os péptidos N6-pepR e C4-pepR foram selecionados para estudar o seu mecanismo de ação ao nível molecular, uma vez que correspondiam às sequências truncadas com menor tamanho possível que ainda apresentavam uma atividade antimicrobiana elevada. O mecanismo de ação destes dois péptidos contra bactérias *S. aureus* ATCC 6538 planctónicas foi primeiramente estudado através da realização de um ensaio de cinética de morte bacteriana. Ambos os péptidos apresentaram uma cinética de morte rápida, sendo possível observar após apenas 15 minutos de exposição ao péptido a uma concentração idêntica à sua MBC aproximadamente 70% de morte, o que sugere uma atuação ao nível da membrana plasmática das

bactérias. Este ensaio foi complementado com estudos de permeabilização membranar (por citometria de fluxo utilizando a sonda SYTOX Green) e de viabilidade celular (utilizando um ensaio de contagem de colônias). Os resultados obtidos mostraram a existência de uma correlação inversa entre estes dois parâmetros, confirmando que a morte bacteriana observada após exposição aos péptidos resulta de uma ação por disrupção membranar.

Por fim, os péptidos N6- e C4-pepR foram ainda testados relativamente à sua capacidade de inibir a formação de biofilmes de *S. aureus* ATCC 6538. Esta avaliação foi efetuada através da realização de dois ensaios: ensaio de viabilidade celular (redução de resazurina) e de quantificação da biomassa formada (por ligação do violeta de cristal). Ambos os péptidos apresentaram capacidade de inibir a formação de biofilmes a concentrações iguais ou superiores a 6.25  $\mu\text{M}$ . A partir desta concentração, observou-se uma redução praticamente total da viabilidade celular e, concomitantemente, a inexistência de matriz extracelular polimérica.

Concluindo, neste trabalho foi possível identificar dois péptidos (N6- e C4-pepR) com atividade antibacteriana e capacidade de inibir a formação de biofilmes. Ambos os péptidos possuem uma sequência menor comparativamente ao pepR (com 23 e 27 resíduos de aminoácidos, respetivamente), possibilitando a sua utilização como “péptidos modelo” para a síntese/otimização de novos fármacos. No futuro, pretende-se proceder à síntese da região putativa, identificada como sendo responsável pela atividade antibacteriana do pepR. Deste modo, será possível comprovar a hipótese colocada sob a relação estrutura-função dos derivados do pepR estudados e, eventualmente, encontrar um derivado do pepR com uma eficácia antibacteriana superior ao pepR e aos segmentos truncados aqui investigados.

**Palavras-Chave:** Péptidos Antimicrobianos (AMPs); Biofilmes; Otimização de péptidos; Resistência bacteriana; Membrana plasmática.